

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-539860

(P2013-539860A)

(43) 公表日 平成25年10月28日 (2013. 10. 28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/533 (2006. 01)	GO 1 N 33/533	2 GO 4 3
GO 1 N 33/536 (2006. 01)	GO 1 N 33/536	D
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	U
GO 1 N 21/64 (2006. 01)	GO 1 N 21/64	F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2013-530331 (P2013-530331)	(71) 出願人	505420286
(86) (22) 出願日	平成23年9月22日 (2011. 9. 22)		バイオセプト, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年5月17日 (2013. 5. 17)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/052837		21, サン ディエゴ ナンシー リッ
(87) 国際公開番号	W02012/040514		ジ ドライブ 5810, スイート 1
(87) 国際公開日	平成24年3月29日 (2012. 3. 29)		50
(31) 優先権主張番号	61/385, 937	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成22年9月23日 (2010. 9. 23)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

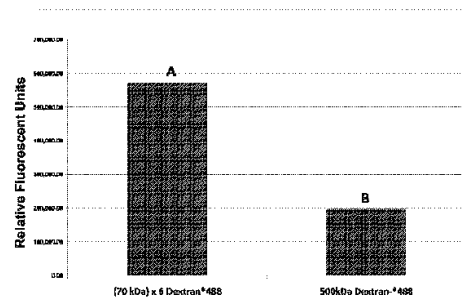
(54) 【発明の名称】 シグナル増幅のための方法と試薬

(57) 【要約】

本発明は、デキストラン部分にコンジュゲートした結合部を含む試薬、このような試薬を作る方法、およびこのような試薬の種々の分子および細胞アッセイへの使用を提供する。本発明は、少なくとも一部は複数のデキストランおよびそれらの配置が検出可能試薬の一部として使用可能であるという発見に基づいている。従って、本発明は種々の検出アッセイ、例えば細胞検出アッセイに有用な、複数のデキストランを含む検出可能試薬を提供する。ある実施形態では、本発明はデキストラン成分にコンジュゲートした結合部を含む検出可能試薬を提供する。デキストラン成分は、さらに、検出可能実体に結合できる。

【選択図】 図 8。

Figure 8



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

デキストラン成分にコンジュゲートした結合部を含む検出可能試薬。

【請求項 2】

デキストラン成分が検出可能実体に結合されている、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

【請求項 3】

デキストラン成分が約 2 ～ 約 10 のデキストラン、約 4 ～ 約 8 のデキストランまたは約 6 のデキストランを含む、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

【請求項 4】

各デキストランが約 10 kDa ～ 約 200 kDa の分子量、約 30 kDa ～ 約 100 kDa の分子量、または約 50 kDa ～ 約 70 kDa の分子量である、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

10

【請求項 5】

デキストランが約 70 kDa の分子量である、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

【請求項 6】

デキストラン成分が 2 つ以上のデキストランを含み、各デキストランが実質的に同じ分子量を有する、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

【請求項 7】

デキストラン成分が 2 つ以上のデキストランを含み、少なくとも 1 つのデキストランが別のデキストランとは異なる分子量を有する、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

20

【請求項 8】

検出対象実体がフルオロフォアである、請求項 2 に記載の検出可能試薬。

【請求項 9】

フルオロフォアが緑色蛍光、オレンジ色蛍光、赤色蛍光、および遠赤外蛍光を有するフルオロフォアから選択される、請求項 8 に記載の検出可能試薬。

【請求項 10】

フルオロフォアが約 350 nm ～ 775 nm の範囲の励起および発光スペクトルを有するフルオロフォアから選択される、請求項 8 に記載の検出可能試薬。

【請求項 11】

フルオロフォアが約 346 nm / 446 nm、約 494 nm / 519 nm、約 554 nm / 570 nm、約 555 nm / 572 nm、約 590 nm / 617 nm、約 651 nm / 672 nm、約 679 nm / 702 nm または約 749 nm / 775 nm の励起および発光スペクトルを有するフルオロフォアから選択される、請求項 10 に記載の検出可能試薬。

30

【請求項 12】

結合部がアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン、免疫試薬、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸、タンパク質 A およびタンパク質 G からなる群より選択される、請求項 1 に記載の検出可能試薬。

【請求項 13】

デキストラン成分を提供し、

デキストラン - 結合部複合体を形成するために、デキストラン成分を結合部とコンジュゲートさせ、および

検出可能実体をデキストラン - 結合部複合体に結合させること、を含む、検出試薬を作る。

40

【請求項 14】

コアデキストラン - 結合部を形成するために、結合部をデキストランにコンジュゲートさせ、

デキストラン - 結合部複合体を形成するために、コアデキストラン - 結合部をデキスト

50

ランと反応させ、および

検出可能実体をデキストラン - 結合部複合体に結合させること、を含む、検出試薬を作る方法。

【請求項 15】

結合部がアビジンである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 2 に記載の検出可能試薬と標的分子を含むと疑われる試料を接触させ、そこに結合部が標的分子に結合でき、および

デキストラン成分に結合した検出可能実体のシグナルを検出し、それにより、標的分子を検出または定量することを含む、標的分子を検出または定量する方法。

10

【請求項 17】

複数の相互連結デキストランを含む試薬であって、少なくとも 2 つのデキストランを含む試薬。

【請求項 18】

デキストランの合計分子量が少なくとも 500 kDa である、請求項 17 に記載の試薬。

【請求項 19】

複数の相互連結デキストランが層状配置または分岐配置に構成されている、請求項 17 に記載の試薬。

【請求項 20】

複数の相互連結デキストランが検出可能実体に結合されている、請求項 17 に記載の試薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2010年9月23日出願の米国特許仮出願第61/385,937号の優先権を主張する。この特許は、参照することによりその全体が組み込まれる。

発明の分野

本発明は、検出アッセイに有用な試薬、例えば、デキストラン部分にコンジュゲートした結合部を含む試薬に関する。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

血液または他の生物試料由来の希少な細胞を単離するプロセスの間に、試料に存在する可能性のある他の有核細胞の中から標的細胞を特定する必要がある。希少な細胞を単離する場合、例えば、白血球細胞(WBC)等の他の種々の細胞も存在する可能性がある。循環腫瘍細胞(CTC)を単離するため、標準的な方法はサイトケラチン抗体を使って上皮細胞を染色し、CTCのみを検出する目的で、抗CD45抗体でさらに染色することにより擬陽性サイトケラチン染色細胞を除外することを含む。

40

【0003】

係属中の特許文献1(この特許は、参照することによりその全体が組み込まれる)には、CTC捕獲用の複数の抗体を使用する方法が記載されている。

【0004】

これらの方法の有用性にもかかわらず、CTC等の細胞の検出のために、さらなる検出試薬および方法が必要とされている。このような試薬および方法は、診断アッセイならびに他の臨床関連アッセイを可能とするであろう。

【0005】

本発明は、生物試料中の細胞の検出のために有用な試薬と方法を記載している。例えば、本発明は生物試料中のCTCなどの希少な細胞の検出に使用できる試薬と方法を提供す

50

る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2010/0255479号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、少なくとも一部は複数のデキストランおよびそれらの配置が検出可能試薬の一部として使用可能であるという発見に基づいている。従って、本発明は種々の検出アッセイ、例えば細胞検出アッセイに有用な、複数のデキストランを含む検出可能試薬を提供する。ある実施形態では、本発明はデキストラン成分にコンジュゲートした結合部を含む検出可能試薬を提供する。デキストラン成分は、さらに、検出可能実体に結合できる。

10

【0008】

ある実施形態では、検出可能試薬のデキストラン成分は約2～約10のデキストラン、約4～約8のデキストランまたは約6のデキストランを含む。各デキストランは約10 kDa～約200 kDaの分子量、約30 kDa～約100 kDaの分子量、または約50 kDa～約70 kDaの分子量であってもよい。ある実施形態では、デキストランは約70 kDaの分子量である。

【0009】

20

ある実施形態では、デキストラン成分は2つ以上のデキストランを含み、各デキストランは実質的に同じ分子量を有する。ある実施形態では、デキストラン成分は2つ以上のデキストランを含み、少なくとも1つのデキストランは別のデキストランとは異なる分子量を有する。

【0010】

ある実施形態では、検出可能実体はフルオロフォアであり、これは緑色蛍光、オレンジ色蛍光、赤色蛍光、および遠赤外蛍光を有するフルオロフォアから選択できる。ある実施形態では、フルオロフォアは約350 nm～約775 nmの範囲の励起および発光スペクトルを有するフルオロフォアから選択される。ある実施形態では、フルオロフォアは約346 nm/446 nm、約494 nm/519 nm、約554 nm/570 nm、約555 nm/572 nm、約590 nm/617 nm、約651 nm/672 nm、約679 nm/702 nmまたは約749 nm/775 nmの励起および発光スペクトルをそれぞれ有するフルオロフォアから選択される。

30

【0011】

ある実施形態では、検出可能試薬の結合部はアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン、免疫試薬、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸、タンパク質Aおよびタンパク質Gから選択される。

【0012】

本発明は、デキストラン成分を提供し、デキストラン成分と反応によりデキストラン-結合部複合体を形成する結合部をコンジュゲートさせ、検出可能実体をデキストラン-結合部複合体に結合させることにより検出可能試薬を作る方法を提供する。

40

【0013】

本発明は、結合部をコアデキストラン-結合部を形成するデキストランにコンジュゲートさせ、コアデキストラン-結合部をデキストラン-結合部複合体を形成するデキストランと反応させ、その後、検出可能実体をコアデキストラン-結合部複合体に結合させることにより検出可能試薬を作る方法を提供する。ある実施形態では、結合部はアビジンである。

【0014】

本発明は、請求項1に記載の検出可能試薬を標的分子を含むと疑われる試料と接触させ、結合部が標的分子に結合でき、デキストラン成分に結合した検出可能実体のシグナルを

50

検出し、その結果標的分子を検出または定量する、標的分子を検出または定量する方法を提供する。

【0015】

本発明は複数の相互連結デキストランを含む試薬であって、この試薬は少なくとも2つのデキストランを含むことを特徴とする試薬を提供する。ある実施形態では、合計分子量は少なくとも500kDaである。ある実施形態では、複数の相互連結デキストランは層状配置または分岐配置として構成される。ある実施形態では、複数の相互連結デキストランは検出対象実体に結合される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】強化染色 - 捕獲細胞の標的細胞表面抗体この図は、マイクロチャンネル上の抗体カクテルで捕獲された細胞を検出するために使用できる3つの異なるタイプの染色方法を示す。反応Aでは、CTC分野でよく使われるように、捕獲細胞は抗CKで染色された。サイトケラチンは細胞質タンパク質であり、細胞は緑色蛍光染料(488と表記)で標識された抗サイトケラチン抗体と培養することにより染色される。反応Bでは、同じ細胞が488染料で標識されたアビジン(アビジン-488)を付与することによりさらに染色された。この場合、抗体は細胞質CKを染色し、ビオチンで標識されていた捕獲抗体に結合することにより、アビジンがさらに細胞表面を染色した。両染色は付加的であり、より強い細胞標識を導く。この実験例を図2に示す。反応Cでは、細胞はサイトケラチン染色されず、アビジン-488のみで染色された。この場合、細胞は細胞表面上のビオチン化捕獲抗体に結合したアビジンの数のみに基づいて可視化された。この実験例を図3に示す。

【図2】染色を増強するために捕獲抗体を使うと、臨床CK⁺CTCの検出が強化される。この図は、乳癌腫瘍細胞の抗体カクテルを使った捕獲、およびCK染色による検出を示す(パネルA)。この場合染色は極めて弱かったが、背景に対し腫瘍細胞として特定されるには充分であった。いつものとおり、これらのCTC細胞は赤色蛍光標識CD45で同時に染色され、この細胞はCD45陰性である。この細胞の位置を記録され、次にマイクロチャンネルをアビジン-488で染色した。パネルBはアビジン-488処理後のこの細胞の再配置を示し、より一層明るく染色されたことを示す。両パネルで白血球細胞(DAPIで核染色)が観察されたが、これらの細胞は検出可能な染色が認められなかった。

【図3】細胞捕獲抗体の標識のみに基づいて血液から捕獲された添加細胞の検出。この図は、捕獲抗体の染色のみに基づく細胞検出の例を示す。この実験では、SKOV細胞が血液中に混ぜられ、試料がCTC捕獲用に通常のように処理された。絶対的尺度ではないが、SKOV細胞の核のサイズは典型的WBCの核よりも通常2~3倍大きい。アビジン-488のみで染色後、SKOV細胞は明るく染色されたが、一方、WBCは検出可能な染色が認められなかった。これは、CK染色されていない細胞またはCKを含まない細胞はそれらの表面捕獲抗体の標識により検出できる可能性があることを立証した。米国特許出願第20100255479号に記載のように、染色は複数の抗体の使用により顕著に強化される可能性がある。

【図4】標識抗サイトケラチンおよび標識ニュートラアビジンで検出された捕獲乳癌細胞の計数。この図は、マイクロチャンネル上の乳癌試料の計数を示す。この実験では、細胞を最初に、標準条件下、蛍光標識488抗CK抗体で染色した。緑色標識細胞を検出し、それらのマイクロチャンネル上のX-Y座標を記録した。次いで、そのチャンネルを緑色蛍光標識アビジンで処理し、細胞表面上の抗体を標識した。CK染色に対する記録とは別の位置で、そのチャンネルを緑色蛍光細胞に対して記録した。従って、特定された全細胞はまたCD45陰性であると判定された。バーチャートは大抵の場合にアビジンがCK染色より有意に多くの細胞を検出したことを示す。同じ条件下で抗CK-488のアビジン-488との組み合わせによる同時染色実験の場合の、健康なドナー血液を使った対照実験では、検出可能な細胞が認められなかった。(データは示さず)。

【図5】NAを凌駕：デキストランを使って染色を増幅。この図は、蛍光染料で標識した

アビジン - デキストランコンジュゲート（検出可能実体を含む代表的検出可能試薬）を図示したものである。アビジン当たりの理論的染料の数は、アビジン単独標識よりも大きくなるであろう。

【図6】SKOV細胞上のFACS蛍光強度この図は、単一ビオチン化EpCAM抗体を使って培養され、その後、（緑色蛍光標識された）アビジン - 488およびアビジン - デキストラン - 488を使って培養したSKOV細胞のFACS分析を示す。最初と二番目のバーは添加したアビジンまたはコンジュゲートを加えているが、ビオチン化EpCAM抗体のない対照細胞の染色強度である。3番目のバーは、アビジン - 488がEpCAM処理細胞に添加された場合の細胞の染色強度を示す。4番目のバーは、アビジン - デキストラン - 488を使って培養した同じ細胞の染色強度を示す。これらのデータは、アビジン - デキストランコンジュゲートがアビジン - 488単独よりも3～4倍大きい蛍光強度を有していたことを示している。

【図7】ADSの利点II - 低WBC染色は、SKOVおよび白血球細胞（WBC）に対し相対的な染色を示す。この実験では、SKOV細胞を血液中に混ぜ、通常通りに処理し、捕獲抗体の抗体カクテルを使ってマイクロチャネル上で捕獲した。次に、異なるチャネル中の細胞をアビジン - 546（546はオレンジ蛍光染料を示す）およびアビジン - デキストラン - 546のみで染色した。AおよびCパネルでは、非常に強く染色された細胞は、オレンジ色蛍光標識された。対応するBおよびDの顕微鏡像はDAPI染色細胞で、SKOVまたはWBCのいずれかの有核細胞を示した。パネルBの場合は、10のDAPI陽性WBCが検出された（矢印で示す）。オレンジ色蛍光標識細胞が適切なフィルターを使って示されている画像が対応するスライドAでは、2秒露出後、10個のWBCの内の9個が、種々のレベルのオレンジ色染色を含むものとして認められる可能性がある。同じ基準をアビジン - デキストラン処理チャネルに適用した場合は、9個のDAPI陽性のWBCがパネルDで検出され、一方、オレンジフィルターを使った対応するパネルCでは、2秒露出後WBCの内の1個のみがわずかに検出された。この実験は、アビジン - デキストラン染色はアビジン単独よりも細胞をより強く染色する（図6）のみならず、周辺のWBCへのより低い背景染色を行うことを立証した。

【図8】70kDa x 6デキストラン*488および500kDaデキストランの間の相対的蛍光。この図は、アビジンにコンジュゲートし、AlexaFluor - 488で蛍光標識した単一の500kDa分子のデキストラン - アミンを使ったことを除いて同じ方法で調製したアビジン - デキストランコンジュゲート（B）と比べて、本発明のアビジン - デキストランコンジュゲート（A）を使ったSKOV細胞の標識により得られた相対的蛍光強度の比較である。各コアアビジン - デキストランコンジュゲートがアビジン分子当たり同等の重量のデキストランを含み、それぞれは同じモル過剰のNH₂ - AlexaFluor - 488で誘導体化されている一方、順次調製された（相互連結デキストラン）コンジュゲートはほぼ3倍高いレベルの細胞蛍光標識を生じた。

【発明を実施するための形態】

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、少なくとも一部は、複数のデキストランおよびそれらの配置が検出可能試薬の一部として使用可能であるという発見に基づいている。従って、本発明は種々の検出アッセイ、例えば、細胞検出アッセイに有用な複数のデキストランを含む検出可能試薬を提供する。ある実施形態では、本発明はデキストラン成分にコンジュゲートした結合部を含む検出可能試薬を提供する。デキストラン成分は、さらに検出可能実体に結合できる。

【0018】

本発明によると、検出可能試薬のデキストラン成分は複数のデキストランの組み合わせ、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超の相互連結デキストランの組み合わせのいずれかであってもよい。ある実施形態では、複数のデキストランは検出可能実体の結合部位の有用性を最大化するように構成されるか相互連結される。他の実施形態では、複数のデキストランは分岐配置で構成されるか相互連結される。

他のある実施形態では、複数のデキストランは層状配置で構成されるか相互連結される。例えば、複数のデキストランは互いの上に整然と、または無秩序に積層できる。他のある実施形態では、複数のデキストランは各デキストランが少なくとももう一つのデキストランに結合されるように構成されるか相互連結される。さらに他のある実施形態では、複数のデキストランは各デキストランが少なくとも2、3、4、5つまたはそれ超の他のデキストランに結合されるように構成されるか相互連結される。

【0019】

さらに他のある実施形態では、複数のデキストランは直接的または間接的に相互連結される。例えば、デキストランは誘導体化等の既知の方法を介して直接的に相互連結してもよい。ある実施形態では、複数のデキストランは間接的に、例えば官能基または反応性部位を導入できる実体または分子を介して相互連結される。他のある実施形態では、複数のデキストランはデキストランまたは検出可能実体を含む他の実体の結合のための官能基、例えばチオールやマレイミド基を提供できる1つまたは複数の分子を介して間接的に相互連結される。ある実施形態では、複数のデキストランは検出対象実体のために結合部位を提供することもできる1つまたは複数の実体、例えば架橋剤、タンパク質または核酸を介して間接的に相互連結される。

10

【0020】

さらにある実施形態では、デキストラン成分は約2～約40のデキストランを含む。ある実施形態では、デキストラン成分は約2～約30のデキストランを含む。ある実施形態では、デキストラン成分は約2～約20のデキストランを含む。ある実施形態では、デキストラン成分は約2～約10のデキストランを含む。ある実施形態では、デキストラン成分は約4～約8のデキストランを含む。ある実施形態では、デキストラン成分は約4、約6または約8のデキストランを含む。

20

【0021】

本発明のデキストラン成分のデキストランは、多様な分子量を有してもよい。ある実施形態では、各デキストランは約10kDa～約200kDaの分子量である。ある実施形態では、各デキストランは約30kDa～約100kDaの分子量である。ある実施形態では、各デキストランは約50kDa～約70kDaの分子量である。ある実施形態では、各デキストランは約70kDaの分子量である。

【0022】

本発明のデキストラン成分は、同様の分子量のデキストランを含んでも、または異なる分子量のデキストランの混合物を含んでもよい。ある実施形態では、各デキストランは、実質的に同じ、または同じ分子量を有する。例えば、デキストラン成分は全て10kDaのデキストラン、全て30kDaのデキストラン、全て70kDaのデキストラン、全て100kDaのデキストランまたは全て200kDaのデキストランの組み合わせでもよい。他の実施形態では、デキストラン成分は少なくとも1つのデキストランが、別のデキストランとは実質的に異なる分子量を有するデキストランの混合物を含む。例えば、デキストラン成分は10kDaのデキストラン、30kDaのデキストラン、70kDaのデキストラン、100kDaのデキストランおよび200kDaのデキストランのいずれの組み合わせでもよい。また他の実施形態では、デキストラン成分は低分子量デキストランおよび高分子量デキストランの混合物を含む。また他のある実施形態では、デキストラン成分はこれらのデキストランの合計分子量が合計で所定の分子量、例えば、約500kDa～約1000kDa、1500kDa、2000kDa、またはそれ超になるデキストランの混合物を含む。

30

40

【0023】

本発明のデキストラン成分は、この分野で既知の、または利用可能ないずれかの適切な方法により作製できる。例えば、デキストラン成分は標準誘導体化法を使って所望のデキストランを逐次的に誘導体化することにより作製できる。

【0024】

検出可能実体は当業者に既知のいずれかの検出可能実体でよく、フルオロフォア、酵素

50

(例えばペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼだがこれに限定されない)、重金属(例えば金またはフェリチンだがこれに限定されない)、標的実体の検出に使用される当業者に既知の放射性標識またはいずれかの他の分子が含まれる。検出可能実体には、蛍光検出アッセイ、酵素検出アッセイ、金検出アッセイ、放射性標識、例えば、放射性の垂リン酸(例えば、 ^{31}P 、 ^{32}P または ^{33}P)、硫黄(例えば、 ^{32}S または ^{35}S)、およびジゴキシゲニン標識で使用されるものを含めてもよい。

【0025】

ある実施形態では、検出可能実体は、フルオロフォアである。フルオロフォアは、市販されており、既知のおよび/または市販のフルオロフォアのいずれも、本発明の検出可能実体として採用可能である。ある実施形態では、フルオロフォアは緑色蛍光(例えば、494 nm / 519 nm)、オレンジ色蛍光(例えば、554 nm / 570 nm)、赤色蛍光(例えば、590 nm / 617 nm)、または遠赤外蛍光(例えば、651 nm / 672 nm)励起/発光スペクトルを示す。ある実施形態では、フルオロフォアは約350 nm ~ 約775 nmの範囲の励起および発光スペクトルを有するフルオロフォアである。ある実施形態では、励起および発光スペクトルは、約346 nm / 446 nm、約494 nm / 519 nm、約554 nm / 570 nm、約555 nm / 572 nm、約590 nm / 617 nm、約651 nm / 672 nm、約679 nm / 702 nmまたは約749 nm / 775 nmである。

【0026】

ある実施形態では、フルオロフォアはAlexaFluor 3、AlexaFluor 5、AlexaFluor 350、AlexaFluor 405、AlexaFluor 430、AlexaFluor 488、AlexaFluor 500、AlexaFluor 514、AlexaFluor 532、AlexaFluor 546、AlexaFluor 555、AlexaFluor 568、AlexaFluor 594、AlexaFluor 610、AlexaFluor 633、AlexaFluor 647、AlexaFluor 660、AlexaFluor 680、AlexaFluor 700、およびAlexaFluor 750(Life Technologies、Inc. (USA)から入手可能なMolecular Probes AlexaFluor dyes)を含んでもよい。ある実施形態では、フルオロフォアはそれに限定されないが、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5およびCy7(Lumiprobe sから入手可能)を含むCy染料を含んでもよい。ある実施形態では、フルオロフォアはDyLight 350、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 550、DyLight 594、DyLight 633、DyLight 650、DyLight 680、DyLight 750およびDyLight 800(ThermoScientific (USA)から入手可能)を含んでもよいがこれらに限定されない。ある実施形態では、フルオロフォアはFluoProbes 390、FluoProbes 488、FluoProbes 532、FluoProbes 547H、FluoProbe s 594、FluoProbes 647H、FluoProbes 682、FluoProbes 752およびFluoProbes 782を含んでもよいがそれらに限定されない。

【0027】

結合部は別の分子または分子の基に結合可能ないずれかの分子または分子の基を含んでもよく、これには、限定されないが、タンパク質および核酸ベース結合部を含む。種々の結合部が当技術分野で既知であり、いずれの既知の結合部が本発明の方法での使用のために意図されてもよい。ある実施形態では、結合部はアビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、ジゴキシゲニン、免疫試薬、オリゴヌクレオチドまたはそれらの誘導体、ペプチドまたはそれらの誘導体、核酸またはその誘導体、ペプチド核酸またはその誘導体、ならびにそれらのタンパク質Aおよびタンパク質Gリガンド結合部分を含むが、それらに限定されない。免疫試薬は抗体またはその抗原結合部分を含んでもよいがそれらに限定されず、

10

20

30

40

50

例えば、F a b断片を含んでもよい。

【0028】

本発明の別の態様によると、検出可能試薬を作る方法が提供される。ある実施形態では、これらの方法は複数の相互連結デキストランを用意し、相互連結デキストランを結合部とコンジュゲートさせることを含む。他のある実施形態では、これらの方法は任意選択で検出可能実体を相互連結デキストランに結合させることを含む。

【0029】

複数の相互連結デキストランを作る方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、標準的NHS（N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル）およびイミノチオランアミン誘導体化試薬を、当分野でよく知られた標準的方法に従って使用できる。複数の相互連結デキストランの結合部へのコンジュゲーションは、いずれかの当分野で既知または利用可能な適切なコンジュゲーション方法に従って行うことができる。ある実施形態では、コンジュゲーションは、2つの実体、例えば、複数の相互連結デキストランおよび結合部の間の1つ以上の共有結合または非共有結合またはこれらの組み合わせを含む。ある実施形態では、結合部、例えば、アビジンをイミノチオランで誘導体化してもよい。イミノチオラン反応は当技術分野で多く報告されている（例えば、購入した市販イミノチオランと一緒に入手可能なThermoScientificのインストラクション；ならびにTraut, R. R., et al. Biochem 12 (17): 3266 - 3273 (1973)を参照）。ある実施形態では、誘導体化反応を行って、アビジン当たり3 ~ 5チオール置換割合を得ることができる。

10

20

【0030】

ある実施形態では、デキストランは、よく使われるヘテロ二官能性試薬、SMCC（スクシンイミジル - 4 - [N - マレイミドメチル]シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート；Pierce Chemical company, Rockford, IL）を使ってデキストラン - アミンを形成するために誘導体化することもできる。SMCC反応は多く報告されており、当技術分野でよく知られている（例えば、市販品として購入されたSMCCと一緒に入手可能なThermoScientificのインストラクション；ならびにIshikawa, E., et al., J Immunassay 4: 209 - 327 (1983)；Brinkley, M. A., Bioconjugate Chem 3: 2 - 13 (1992)；およびMattson, G., et al., Molecular Biology Reports 17: 167 - 83 (1993)を参照）。ある実施形態では、誘導体化反応を行い、デキストラン当たり1 ~ 2マレイミド基を得ることができる。ある実施形態では、複数の相互連結デキストランは所望の量のデキストランの逐次的誘導体化により作ることができる。

30

【0031】

検出可能実体は、種々の方法により検出可能試薬に付加または結合でき、これらの全ての方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、フルオロフォア（蛍光染料とも呼ばれることも多い）をデキストラン分子に付加または連結するためにNHS反応を採用できる。ある実施形態では、フルオロフォアはNHSエステル、スクシンイミジルエステル（SE）またはテトラフルオロフェニル（TFP）エステルであってもよい。市販のフルオロフォアはフルオロフォアを他の分子に付加するための詳細なインストラクションを含み、これらのフルオロフォア標識方法は当技術分野でよく知られている（例えば、購入フルオロフォアまたは他の検出対象実体と共に入手可能な製品パンフレット；ならびにProudnikov D., et al., Nucleic Acids Research 24 (22): 4535 - 4542 (1996)、核酸化学の最新プロトコル（Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry）、2003；分子生物学の最新プロトコル（Current Protocols in Molecular Biology）（2002）；および免疫学の最新プロトコル（Current Protocols in Immunology）（2002）を参照）。

40

50

【0032】

ある実施形態では、検出可能試薬を作る方法は結合部をデキストランとコンジュゲートさせてコアダキストラン - 結合部を形成し、そのコアダキストラン - 結合部を1つ以上のデキストランとコンジュゲートさせること、つまりデキストランの1つ以上の層または分岐部にコアダキストラン - 結合部を逐次的に付加することを含む。得られたデキストラン - 結合部複合体は、任意選択で検出可能実体に結合できる。

【0033】

ある実施形態では、デキストランは、例えばNHSEステルのアミン反応性誘導体を使う場合に、1次反応性部位を提供するために使用できる。他のある実施形態では、デキストランを、他の分子、例えば、デキストランまたは検出可能実体と反応させる、またはそれらと連結させるのに有用な2次機能性、官能基または反応性部位、例えば、チオールまたはマレイミド基を導入するために使用できる。他のある実施形態では、デキストランを使用して、例えば、デキストランまたは検出可能実体と連結させるための、さらなる官能基、反応性部位または結合部位を提供するために他の実体と反応させることができる。例えば、蛍光分子のNHSEステルを使う代わりに、フィコエリトリン等のタンパク質をデキストランに結合させて、内因性蛍光標識レベルを与えることができる。別の例では、核酸を、デキストラン中に導入して、反応における他の分子のための第2の結合部位として機能させるか、またはさらなる官能性のためのプローブとして機能させることができる。

【0034】

さらに他の実施形態では、本発明はアビジンベース検出可能試薬を作る方法を提供する。ある実施形態では、方法は、デキストラン - アミンを誘導体化してマレイミド基を生成すること、およびアビジンを誘導体化してチオール基を生成することを含んでもよい。次に、誘導体化アビジンを、あるモル比率の1つ以上の誘導体化デキストラン - アミン分子と反応させるが、この場合、誘導体化アビジンと誘導体化デキストラン - アミンの反応により、デキストラン - アビジンを生じる。次に、デキストラン - アビジンを誘導体化して、デキストラン当たり1つまたは複数のチオール基を生成し、誘導体化デキストラン - アビジンを、あるモル比率の1つまたは複数のマレイミド - 誘導体化デキストランアミン分子とさらに反応させるが、この場合、誘導体化デキストラン - アビジンとマレイミド - 誘導体化デキストランアミンの間の反応により、層状または分岐デキストラン - アビジン複合体を生じる。次に、任意選択で、デキストラン - アビジン複合体と、あるモル比率の1つまたは複数の検出対象実体と反応させてもよく、この場合、デキストラン - アビジン複合体と検出対象実体との反応により、本発明の検出可能試薬を生ずる。

【0035】

ある実施形態では、アビジンをイミノチオランで誘導体化し、アビジン当たり3～5チオールを得た。その後、よく使われるヘテロ二官能性試薬、SMCC（スクシンイミジル - 4 - [N - マレイミドメチル]シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート、Pierce Chemical company、Rockford、IL）を使って、1～2つのマレイミド基で誘導体化された3倍モル過剰の70kDaデキストラン - アミンを添加した。アビジン - デキストランをイミノチオランでさらに誘導体化し、デキストラン当たり2～3つのチオールの置換割合を得て、次に、元のアビジンに対し6倍モル過剰のデキストランと共にさらにインキュベートした。次に、デキストラン - アビジン複合体を、デキストランに対し10倍過剰のNHSE - フルオロフォアで標識できる。ある実施形態では、フルオロフォアは、AlexaFluor 488またはAlexaFluor 546である。

【0036】

試薬のモル比は、所望の数のマレイミド基、チオール基または検出可能実体に対する所望の標識度合を得るために調節でき、このような変更は当技術分野でよく知られている。反応は当業者により容易に調節でき、所望の反応を得ることができる。例えば、特定の適用のための要望どおりに、特定の数のマレイミドおよびチオール基を得るために反応を変更することができる。

10

20

30

40

50

【0037】

本発明はまた、標的分子の検出または定量化方法を提供する。このような方法は、本発明の検出可能試薬を標的実体を含むと疑われる、検出試薬の結合部が標的実体に結合できる試料と接触させ、その後標的分子を検出または定量するために検出可能実体シグナルを検出することを含んでいる。標的実体はタンパク質、タンパク質の基、ペプチド、核酸または細胞を含むことができるがこれらに限定されない。

【0038】

試料は、任意の生物学的または非生物試料を含むことができる。ある実施形態では、試料は任意の未処理または処理済細胞、組織および/またはヒト分泌試料を含む。他のある実施形態では、試料は任意の核酸、タンパク質、または未加工生物試料から部分的にまたは完全に単離または精製された細胞内成分を含んでいる。他のある実施形態では、本発明に有用な試料は血清、血液、血漿、全血およびそれらの誘導体、皮膚、髪、毛包、唾液、口腔粘液、腔液、汗、涙、上皮組織、尿、精子、精液、精漿、前立腺液、尿道球腺液（カウパー氏腺液）、排泄物、生検、腹水、脳脊髄液、リンパ液、および組織抽出物試料もしくは生検またはこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない。（例えば、分子生物学の方法（*Methods in Molecular Biology*）、Ed. Antonia Vlahou（2008）中の、臨床的プロテオミクス：方法とプロトコル（*Clinical Proteomics: Methods and Protocols*）、Vol. 428；および *Mutation Research*、543（3）：217-234（2003）中の、Holland、N.、*Mutation Research / Reviews*を参照されたい。これら文献は、全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）

検出と定量に関する方法について、そういった方法は当技術分野でよく知られており、いずれの標準的方法も採用できる。当業者なら、本発明の検出可能試薬と一緒に採用される検出可能実体に基づいてどの方法を採用すべきが容易にわかるであろう。このような検出と定量プロトコルはよく知られており、いずれの標準的方法も採用可能である。（例えば、分子生物学の最新プロトコル（*Current Protocols in Molecular Biology*）、Ed. Ausubel、Frederick M.（2010）；タンパク質科学の最新プロトコル（*Current Protocols in Protein Science*）、Last、Ed. Coligan、John E.、et al.（2010）；核酸化学の最新プロトコル（*Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*）、Ed. Egl i、Martin（2010）；および分子クローニング：実験マニュアル（*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*）、Third Edition、Sambrook、Joseph（2001）、を参照されたい。これら全ての文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。）

【0039】

本発明の検出可能試薬は、イムノアッセイ（例えば、ELISA）、細胞選別アッセイ（限定されないが、例えば、FACS）、フローサイトメトリーアッセイ、核酸アッセイ、タンパク質アッセイ、薬剤相互作用アッセイ、マイクロ流体アッセイ、希少な細胞検出もしくはは定量、または当技術分野で現在使用され、報告されているいずれか他の種々の選別、検出もしくはは定量アッセイと一緒に使用できる。このようなアッセイは、マニュアル式でも、自動式であってもよい。ある実施形態では、本発明の試薬は例えばマイクロチャネルまたは他のマイクロ流体装置と一緒にでの使用が見出されている。

【0040】

本発明の検出可能試薬は、標的実体（例えば、分子、タンパク質および/または核酸）の検出と定量に使用できる。このような標的実体には希少な細胞を含めてもよい。ある実施形態では、希少な細胞には通常の生物試料中には存在せず、疾患または異常な病態の指標として存在する可能性のある細胞を含んでもよい。ある実施形態では、これらの細胞は試料中の他の細胞より1桁以上少なく存在する。このような疾患または病態には慢性疾患

10

20

30

40

50

(例えば癌)、傷害または妊娠を含んでもよい。ある実施形態では、希少な細胞には生物学的試料中に正常に存在するが、試料中に存在する他の細胞より1桁以上少ない頻度で存在する細胞を含んでもよい。希少な細胞は循環性腫瘍細胞(CTC)、胎生細胞および幹細胞を含んでもよいがこれらに限定されない。

【0041】

種々の検出可能実体由来のシグナルを比較する方法は当技術分野でよく知られており、当業者ならこのような比較分析を実行する方法が容易にわかるであろう。強化され、増加され、および/または増幅された検出は1つ以上の検出可能実体に直接コンジュゲートした結合部、または1つ以上の検出対象実体を含む単一デキストランにコンジュゲートした結合部と比較できる。強化され、増加さえ、および/または増幅された検出は、例えば、非標的実体(例えば、白血球細胞:WBCに対し結合減少等)に対する結合減少、減少した非特異的結合、増加した検出対象実体シグナル(例えば、フルオロフォアからの増加した光シグナル、放射標識からの増加した放射性シグナル、または酵素反応からの増加した光)、ならびに増加したアッセイ感度(例えば、試料中の希少な細胞の検出レベルが高められ、それにより、さらに希少な細胞が検出できる)を含めてもよい。CTC、胎生細胞、幹細胞または他の希少な細胞等の標的実体検出の選択性の増加はまた、本発明の検出可能試薬を使って実現できる。本発明の検出可能試薬は、試料中で検出されるCTCの数を増やすことをために、臨床的試料中のCK染色細胞の検出を高めるように使用でき、また同様に、種々のアッセイにおけるCK染色を含まない細胞を検出するように使用できる。

10

20

【0042】

ある実施形態では、本発明の検出可能試薬は、本発明のデキストラン成分が無い場合検出可能実体にコンジュゲートした結合部、または1つ以上の検出可能実体を含む単一のデキストランにコンジュゲートした結合部から達成される検出に比べて、強化され、増加され、および/または増幅された検出を提供する。ある実施形態では、本発明の検出可能試薬が検出可能実体にコンジュゲートした場合、検出可能試薬は、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍あるいはそれ以上のシグナルを与える。ある実施形態では、本発明の検出可能試薬が非標的実体に対する非特異的結合を減らすあるいは低下させた。ある実施形態では、減らされた非特異的結合がノイズ比に対して5、6、7、8、9、10またはそれ以上の増加した/改良されたシグナルを有する検出試薬をもたらす。

30

【0043】

実施例

以下の実施例は例示のために提供されるものであり、請求項記載の発明を制限するものではない。

実施例1: 蛍光標識アビジン-デキストランバイオコンジュゲートを使った、Biocept社マイクロチャンネル中の強化された細胞染色

本実施例は臨床試料中のCK染色細胞の検出を強化するために使用でき、またCK染色を含まない細胞の検出に使用できる代替染色用試薬と方法について記載する。強化または増幅された染色は、アビジン等の結合部を蛍光標識(フルオロフォア検出可能実体)を含むアミノ-デキストランにコンジュゲートすることにより達成された。この強化されたバージョンのアビジンは、蛍光標識アビジンよりも数倍明るく、重要なことに血液中の非標的細胞に対するより低い非特異的結合を有していた。累積的にこれは蛍光標識アビジン-デキストランは、5~10倍優れたシグナル対ノイズ比であることを意味した。非標的白血球細胞(WBC)に対するより少ない非特異的結合により、これは捕獲CTCの選択的検出において別の利点を提供した。

40

【0044】

蛍光標識アビジン-デキストランの調製

これらの実験では、標準NHSおよびイミノチオランアミン誘導体化試薬を使った。これらの試薬に対する基本的反応条件は、当技術分野でよく知られている。しかし、これらのコンジュゲートのそれぞれに対するインキュベーションの順序とモル比は、アビジン-デキストランコンジュゲートの最終的性能にとって重要であった。以下は、アビジン-デ

50

キストランコンジュゲートの調製のための好ましい実施形態である。アビジン当たり3～5つのチオール置換割合を達成するために、アビジンをイミノチオランで誘導体化した。これに、3倍モル過剰の70 kDaデキストラン-アミンを添加した。このデキストラン-アミンは、よく使われるヘテロ二機能性試薬、SMCC（スクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシラート；Chemical company、Rockford、IL）を使って1～2マレイミド基で誘導体化されていた。NHSは、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステルである。アビジン-デキストランコンジュゲートができるとすぐに、デキストラン当たり2～3つのチオール置換割合を達成するためにイミノチオランでさらに誘導体化し、次に元のアビジンに対し6倍モル過剰のデキストランと共にさらにインキュベートした。最終的に、このコンジュゲート

10

を現在の試料中でデキストランに対し10倍過剰のNHS-蛍光染料（488または546）で標識した。マレイミド、チオール基のモル比または蛍光標識度合は調節して、コンジュゲートに対する特性を変更してもよい。このプロセスは70 kDaの4～8個が結合したデキストランを有するアビジンを生ずることが見込まれ、本実施例中ではこれをアビジンベース検出可能試薬70 kDaデキストランとした。

【0045】

代替アビジン-デキストランコンジュゲート、500 kDaデキストラン-アミンを使って調製した。この場合、同じ誘導体化試薬を採用した。チオール化アビジンを上述のように調製した。500 kDaデキストラン-アミンもSMCCを使って記載のように誘導体化され、アビジンにコンジュゲートした。本実施例では、500 kDaアビジン-デキ

20

ストランコンジュゲートを、次に、70 kDaデキストラン-アミンを使った逐次的プロセスで使用されたのと同様に、同じモル比過剰（10倍）を使ってNHS-AlexaFluor 488で蛍光標識した。この試薬は本実施例でアビジンベース試薬500 kDaデキストランとする。

【0046】

結果と考察

マイクロチャンネル上で抗体カクテルにより捕獲されている細胞を検出するために、3つの異なるタイプの染色方法を使うことができる（図1参照）。反応Aでは、CTC分野で一般的にそのまま採用されるように、捕獲細胞を抗CKで染色した。サイトケラチンは細胞質のタンパク質であり、細胞は緑色蛍光染料（488と表記）で標識した抗サイトケ

30

ラチン抗体と共にインキュベートすることにより染色した。反応Bでは、同じ細胞をアビジン-488（488染料で標識したアビジン）を加えることによりさらに染色した。この場合、抗体が細胞質CKを染色し、アビジンがビオチン標識捕獲抗体に結合することにより細胞表面をさらに染色した。両染色は付加的であり、より強い細胞標識を生ずる。この一例を図2で参照する。反応Cでは、細胞をサイトケラチンでは染色しなかったが、アビジン-488のみで染色した。この場合は、細胞は細胞表面のビオチン化捕獲抗体に結合したアビジンの数のみに基づいて可視化された。この実験例を図3に示す。

【0047】

乳癌腫瘍細胞の抗体カクテルによる捕獲、およびCK染色によるその検出（パネルA）を図2に示す。この場合、染色は極めて弱い、腫瘍細胞として特定されるには背景に対して十分に強い。通例のように、これらのCTC細胞を赤色蛍光標識CD45で同時に染色し、この細胞はCD45陰性である。この細胞の位置を記録し、次いでマイクロチャンネルをアビジン-488で染色した。パネルBはアビジン-488処理後のこの細胞の再配置を示し、さらにより一層明るく染色されたことを示す。両パネルで、白血球細胞（DAPIで核染色）が観察されたが、これらの細胞は検出可能な染色が認められなかった。

【0048】

捕獲抗体の染色のみに基づく細胞検出の例を図3に示す。この実験では、SKOV細胞が血液中加入され、試料がCTCの捕獲のために処理された（例えば、米国特許出願第20100255479号参照）。絶対的尺度ではないが、SKOV細胞の核のサイズは通常典型的WBCの核よりも2～3倍大きい。アビジン-488のみで染色後、SKOV

40

50

細胞は明るく染色されたが、一方、WBCは検出可能な染色が認められなかった。これは、CK染色されていない細胞またはCKを含まない細胞はそれらの表面捕獲抗体の標識により検出できる可能性があることを立証した。米国特許出願第20100255479号に記載のように、この染色は複数の抗体の使用により顕著に強化される可能性がある。

【0049】

マイクロチャンネル上の乳癌試料の計数を図4に示す。この実験では、細胞を最初に標準条件下、蛍光標識488抗CK抗体で染色した。緑色標識細胞を検出し、それらのマイクロチャンネル上のX-Y座標を記録した。次いで、そのチャンネルを緑色蛍光標識アビジンで処理し、細胞表面上の抗体を標識した。CK染色に対する記録以外の位置で、そのチャンネルを緑色蛍光細胞に対して記録した。特定された全細胞はまたCD45陰性であると判定された。バーチャートは大抵の場合に、アビジンはCK染色より有意に多くの細胞を検出したことを示す。同じ条件下で、抗CK-488のアビジン-488との組み合わせによる同時染色実験の場合の健康なドナー血液を使った対照実験では、検出可能な細胞が認められなかった。(データは示さず)。

【0050】

蛍光染料で標識したアビジンデキストランコンジュゲート(アビジンベース検出試薬)を模式的に表現したものを図5に示す。アビジン当たりの理論的染料の数は、アビジン単独標識よりも大きくなるであろう。

【0051】

図6に、単一ビオチン化EpCAM抗体と培養し、その後アビジン-488(緑色蛍光標識アビジン)およびアビジン-デキストラン-488(アビジンベース検出試薬70kDaデキストラン)と培養したSKOV細胞のFACS分析を示す。最初と二番目のバーは、添加したアビジンまたはコンジュゲートを有するが、ビオチン化EpCAM抗体のない対照細胞の染色強度である。3番目のバーは、アビジン-488がEpCAM処理細胞に添加された場合の細胞の染色強度を示す。4番目のバーは、アビジン-デキストラン-488とインキュベートした同じ細胞の染色強度を示す。これらのデータは、アビジン-デキストランコンジュゲートが、アビジン-488単独よりも3~4倍大きい蛍光強度を有していたことを示している。

【0052】

SKOVおよび白血球細胞(WBC)のアビジン-546(オレンジ蛍光標識アビジン)およびアビジン-デキストラン-546(アビジンベース検出試薬70kDaデキストラン)による相対的染色である。この実験では、SKOV細胞を血液中加入し、通常通りに処理し、捕獲抗体用の抗体カクテルを使ってマイクロチャンネル上で捕獲した。次に、異なるチャンネル中の細胞を、アビジン-546(546はオレンジ蛍光染料を示す)およびアビジン-デキストラン-546のみで染色した。AおよびCパネルでは、非常に強く染色された細胞は、オレンジ色蛍光標識されている。対応するBおよびDの顕微鏡像は、DAPI染色細胞であり、SKOVまたはWBCのいずれかの有核細胞を示した。パネルBの場合は、10DAPI陽性WBCが検出された(矢印で示す)。オレンジ色蛍光標識細胞が適切なフィルターを使って示されている、画像が対応するスライドAでは、2秒露出後、10個のWBCの内の9個が、種々のレベルのオレンジ色染色を含むものとして認められる可能性がある。同じ基準をアビジン-デキストラン処理チャンネルに適用した場合は、9個のDAPI陽性のWBCがパネルDでは検出され、一方、オレンジフィルターを使った対応するパネルCでは、2秒露出後WBCの内の1個のみがわずかに検出された。この実験は、アビジン-デキストラン染色は、アビジン単独よりも細胞をより強く染色する(図6)のみならず、周辺のWBCへの、より低い背景染色を行うことを立証した。

【0053】

アビジンにコンジュゲートし、AlexaFluor-488で蛍光標識した単一の500kDa分子のデキストラン-アミンを使ったことを除いて同じ方法で調製したアビジン-デキストランコンジュゲート(B;アビジンベース検出試薬500kDaデキストラン)と比べて、本発明のアビジン-デキストランコンジュゲート染色(A;アビジンベ

10

20

30

40

50

ス検出試薬 70 kDa デキストラン) を使った S K O V 細胞の標識により得られた相対的蛍光強度の比較である。各コアアビジン - デキストランコンジュゲートは、アビジン分子当たり同程度の重量のデキストランを含み、それぞれは、同じモル過剰の N H S - A l e x a F l u o r - 4 8 8 で誘導体化されているが、順次調製された層状または分岐デキストランを含むコンジュゲートは、ほぼ 3 倍高いレベルの蛍光細胞標識を生じた。

【 0 0 5 4 】

本明細書で考察、引用した全公報は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。記載された特定の方法、プロトコルおよび材料は、変わってもよいので、開示された発明は、これらに限定されないことは理解されよう。また、本明細書で使用された用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためのものであり、添付請求項のみにより限定される本発明の範囲を制限する意図はないことも理解されよう。

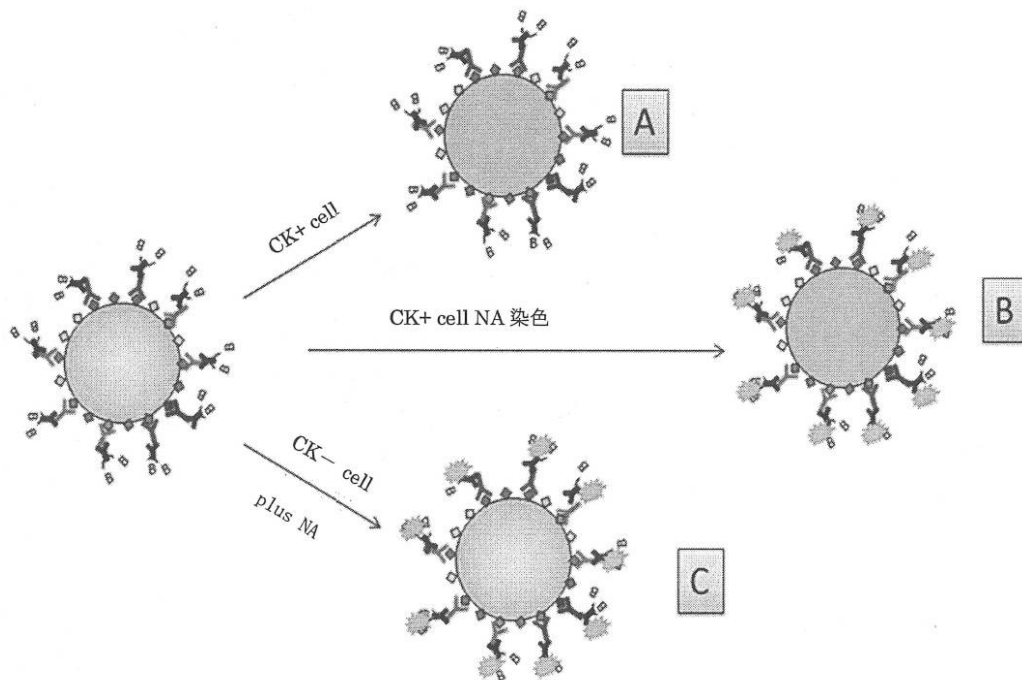
10

【 0 0 5 5 】

当業者なら、単に、ルーチン実験を行うだけで、本明細書記載の発明の具体的実施形態に対する多くの等価物を認識または確認できるであろう。このような等価物は、添付の請求項に包含されるべきであることが意図されている。

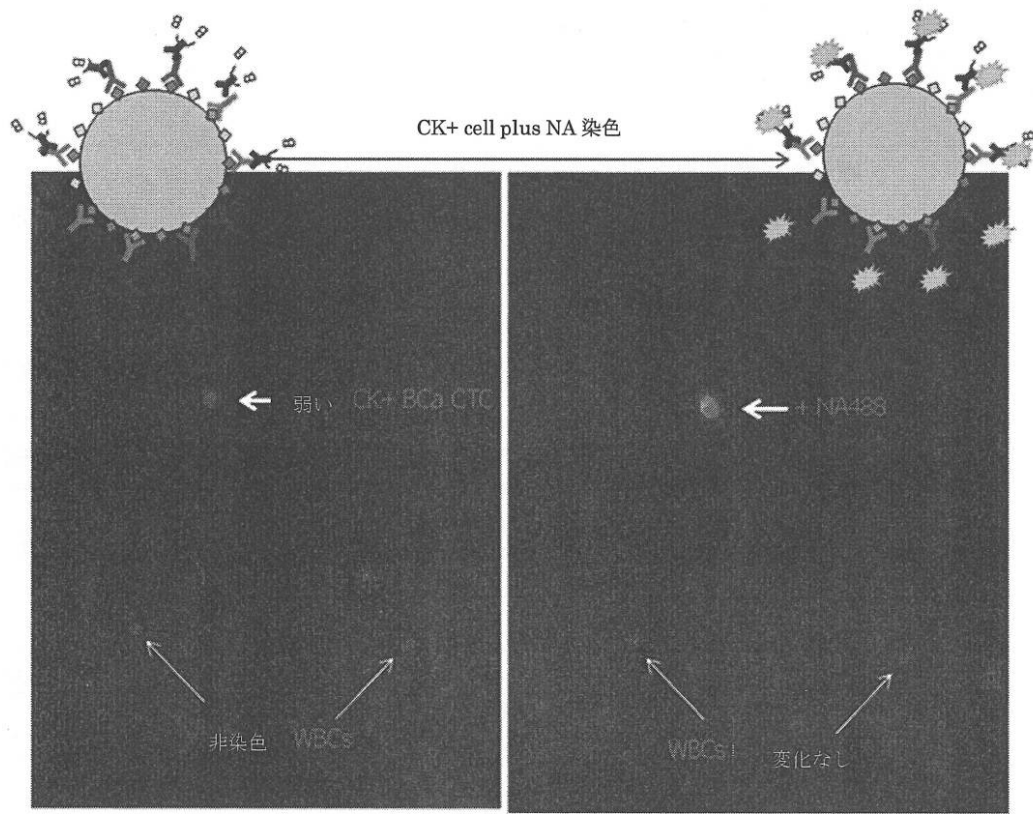
【 図 1 】

【 図 1 】



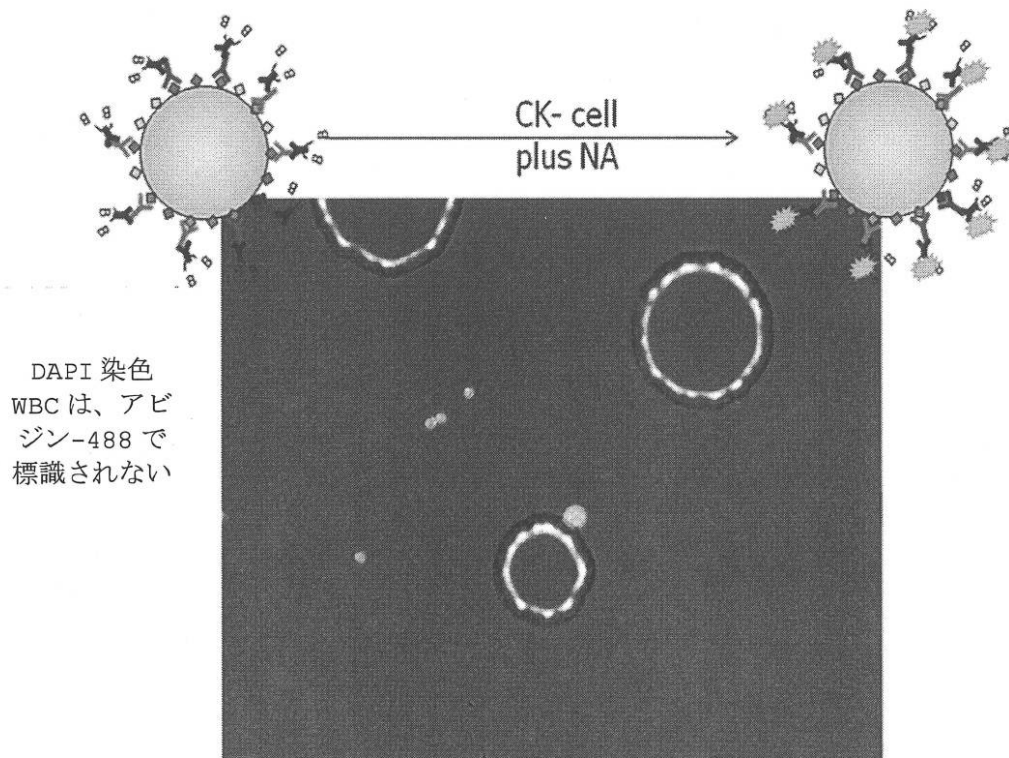
【図 2】

【図 2】



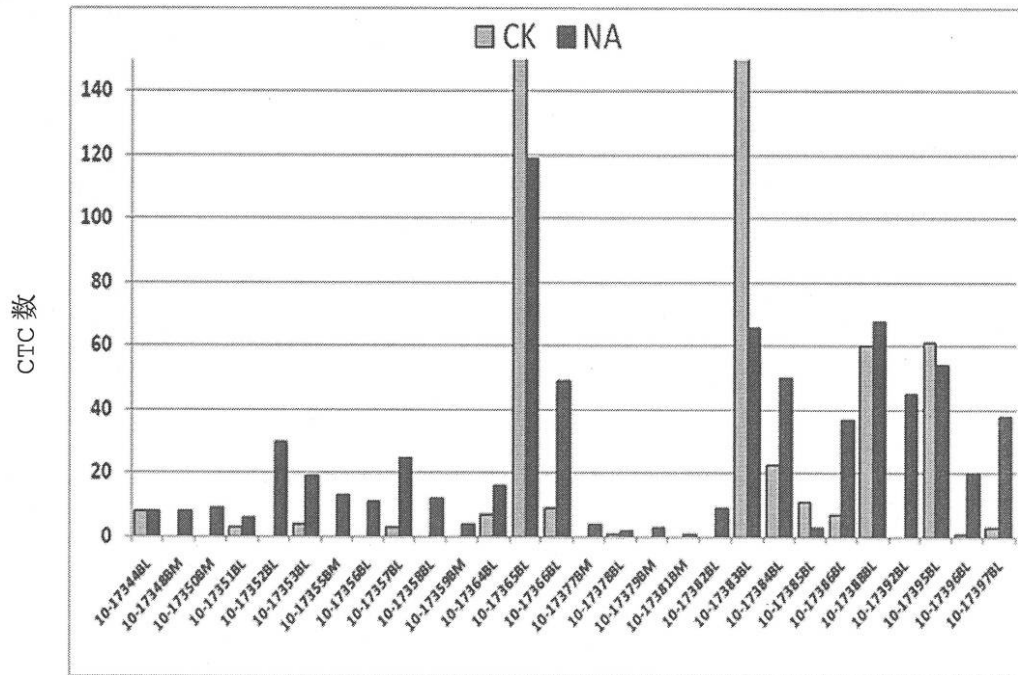
【図 3】

【図 3】



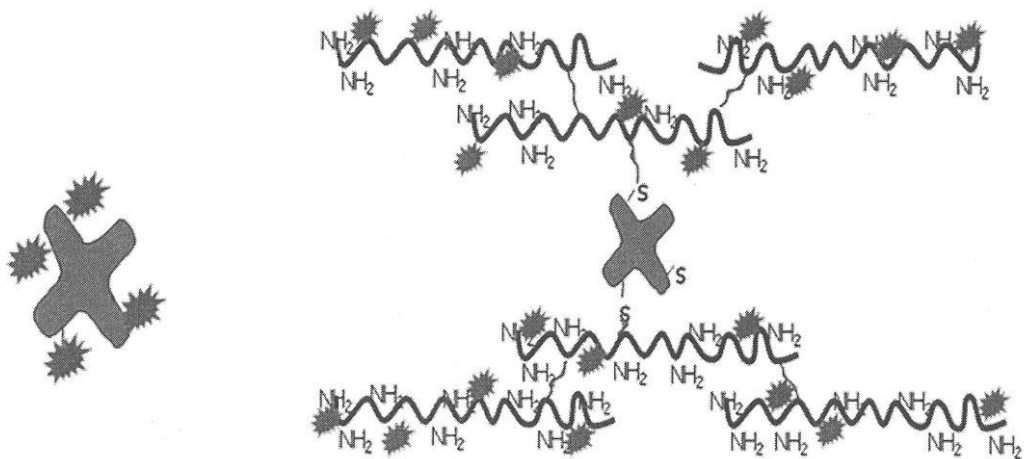
【図 4】

【図 4】



【図 5】

【図 5】

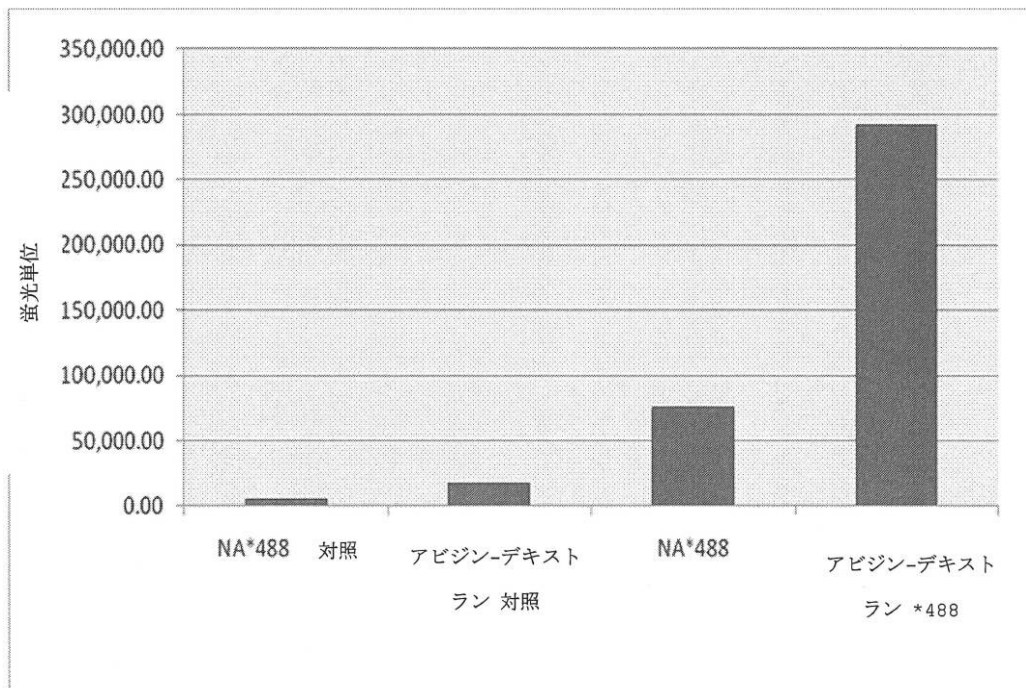


NA-546

アビジン-デキストラン染色 , ADS-546

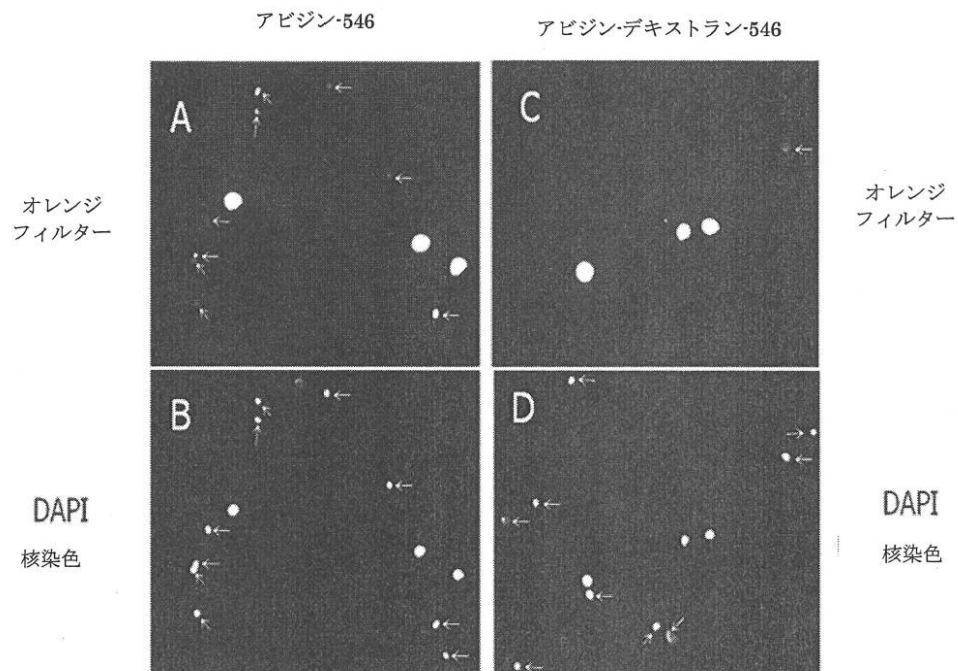
【図 6】

【図 6】



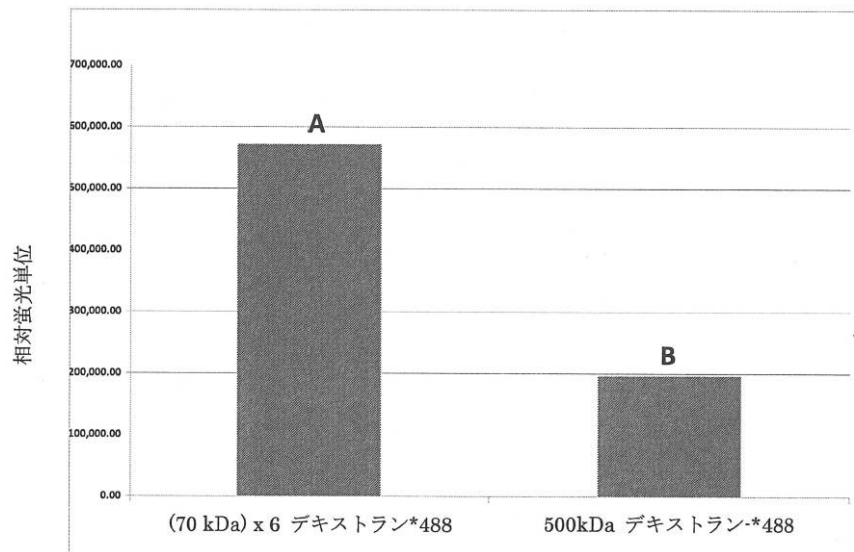
【図 7】

【図 7】



【図 8】

【図 8】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/052837
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/58; G01N 33/548; G01N 33/53; C12Q 1/70; G01N 33/543; C12Q 1/68; G01N 33/68; C12M 1/34		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: detectable reagent, binding moiety, dextran, avidin, flourophore		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 05846741 A (GRIFFITHS GARY L. et al.) 08 December 1998 See claims 1,3.	1,2,12 3-11, 13-20
A	US 2007-0037174 A1 (RAMPAL et al.) 15 February 2007 See the whole document.	1-20
A	US 2010-0081125 A1 (XIA ZONG-LI et al.) 01 April 2010 See the whole document.	1-20
A	WO 2009-070742 A2 (GREAT BASIN SCIENTIFIC) 04 June 2009 See the whole document.	1-20
A	WO 99-40438 A1 (SYNBIOTICS CORPORATION) 12 August 1999 See the whole document.	1-20
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 APRIL 2012 (13.04.2012)		Date of mailing of the international search report 13 APRIL 2012 (13.04.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Moon, Dong Hyun Telephone No. 82-42-481-8298 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/052837

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 05846741 A	08.12.1998	AU 1996-59458 B2	11.02.1999
		AU 1996-59458 C	12.09.1996
		AU 1997-37323 B2	26.04.2001
		AU 1999-18258 A1	05.07.1999
		AU 2000-20302 A1	26.06.2000
		AU 2000-20302 B2	12.02.2004
		CA 2133833 A1	14.10.1993
		CA 2133833 C	22.12.2009
		CA 2163107 A1	24.11.1994
		CA 2163107 C	17.04.2001
		CA 2223261 A1	19.12.1996
		CA 2223261 C	11.05.2010
		CA 2353612 A1	15.06.2000
		CA 2353612 C	09.02.2010
		EP 0208531 A2	14.01.1987
		EP 0208531 B1	12.04.1995
		EP 0637933 A1	17.03.2004
		EP 0637933 B1	13.10.2004
		EP 0656115 A1	05.07.2000
		EP 0700304 A1	31.10.2001
		EP 0837696 A1	28.09.2005
		EP 0837696 B1	24.02.2010
		EP 0920623 A1	21.11.2001
		EP 0920623 B1	18.06.2003
		EP 1135160 A2	26.09.2001
		EP 1135160 B1	18.04.2007
		EP 1375519 A2	02.01.2004
		EP 1375519 A3	30.06.2004
		EP 1384488 A2	28.01.2004
		EP 1384488 A3	23.06.2004
		EP 1384488 B1	02.09.2009
		EP 1393750 A2	03.03.2004
		EP 1393750 A3	31.03.2004
		EP 1393750 B1	02.09.2009
		JP 07-116060 B2	13.12.1995
		JP 08-510250 A	29.10.1996
		JP 09-505799 A	10.06.1997
		JP 11-507046 A	22.06.1999
		JP 2000-516217 A	05.12.2000
		JP 2002-531523 A	24.09.2002
		JP 2006-083183 A	30.03.2006
		JP 2010-184948 A	26.08.2010
		JP 2102186 C	22.10.1996
		JP 62-042935 A	24.02.1987
		KR 10-0220864 B1	15.09.1999
		US 04735210A A	05.04.1988
		US 05101827A A	07.04.1992
		US 05525338A A	11.06.1996
		US 05697902A A	16.12.1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/052837

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 05698405A A	16.12.1997
		US 05736119A A	07.04.1998
		US 05776093A A	07.07.1998
		US 05776094A A	07.07.1998
		US 05776095A A	07.07.1998
		US 05922302A A	13.07.1999
		US 05958408A A	28.09.1999
		US 05965131A A	12.10.1999
		US 06120768A A	19.09.2000
		US 2002-0052594 A1	02.05.2002
		US 2006-0067885 A1	30.03.2006
		US 2011-0117105 A1	19.05.2011
		US 6228362 B1	08.05.2001
		US 6331175 B1	18.12.2001
		US 7811570 B2	12.10.2010
		WO 00-33874 A2	15.06.2000
		WO 00-33874 A3	15.06.2000
		WO 93-19668 A1	14.10.1993
		WO 94-04702 A3	03.03.1994
		WO 94-26297 A1	24.11.1994
		WO 96-40245 A1	19.12.1996
		WO 98-04293 A1	05.02.1998
		WO 98-04917 A1	05.02.1998
		WO 99-30745 A2	24.06.1999
		WO 99-30745 A3	24.06.1999
US 2007-0037174 A1	15.02.2007	None	
US 2010-0081125 A1	01.04.2010	US 2006-0046310 A1	02.03.2006
WO 2009-070742 A2	04.06.2009	CA 2705984 A1	04.06.2009
		CA 2705985 A1	04.06.2009
		EP 2225398 A2	08.09.2010
		EP 2225398 A4	09.02.2011
		EP 2225561 A2	08.09.2010
		EP 2225561 A4	14.09.2011
		US 2010-0304387 A1	02.12.2010
		US 2011-0039260 A1	17.02.2011
		WO 2009-070640 A2	04.06.2009
		WO 2009-070640 A3	03.09.2009
		WO 2009-070640 A3	04.06.2009
		WO 2009-070742 A3	16.07.2009
		WO 2009-070742 A3	04.06.2009
WO 99-40438 A1	12.08.1999	None	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ミコラジック, スティーブン ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92117, サン ディエゴ, コンラッド アベニュー
4052

(72)発明者 ミラー, リサ エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92019, エル ケイジョン, ビスタ グランデ ロード
1671

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 EA01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013539860A5	公开(公告)日	2014-11-13
申请号	JP2013530331	申请日	2011-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	生物概念股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物概念公司		
[标]发明人	ミコラジックスティーブンディー ミラーリサエス		
发明人	ミコラジック, スティーブン ディー. ミラー, リサ エス.		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/536 G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/58 C08B37/0021 C08L5/02 G01N33/52 G01N33/533 G01N33/548 G01N33/583		
FI分类号	G01N33/533 G01N33/536.D G01N33/53.U G01N21/64.F		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/EA01		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/385937 2010-09-23 US		
其他公开文献	JP2013539860A JP6234817B2		

摘要(译)

本发明提供了包括与葡聚糖部分缀合的结合部分的试剂，制备此类试剂的方法以及此类试剂在各种分子和细胞测定中的用途。本发明至少部分地基于以下发现：多个葡聚糖及其构型可以用作可检测试剂的一部分。因此，本发明提供了包含多种右旋糖酐的可检测试剂，其可用于多种检测测定中，例如细胞检测测定。在某些实施方案中，本发明提供了一种可检测试剂，其包含与葡聚糖组分缀合的结合部分。右旋糖酐成分可以进一步与可检测的实体结合。[选择图]图8。